



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 334 748**

⑫ Número de solicitud: 200802603

⑤① Int. Cl.:  
**G01N 27/333** (2006.01)  
**H01G 9/04** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

④② Fecha de presentación: **12.09.2008**

④③ Fecha de publicación de la solicitud: **15.03.2010**

④③ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**15.03.2010**

⑦① Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones  
Científicas (CSIC)**  
**c/ Serrano, 117**  
**28006 Madrid, ES**

⑦② Inventor/es: **Stoica, Anca Lulia;**  
**Viñas, Clara y**  
**Teixidor, Francesc**

⑦④ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑤④ Título: **Sensores potenciométricos basados en clusters de boro aniónicos.**

⑤⑦ Resumen:

Sensores potenciométricos basados en clusters de boro aniónicos.

Sensor potenciométrico que comprende un electrodo selectivo a iones y este a su vez una membrana caracterizada porque comprende: un material termoplástico; una sustancia electroactiva basada en una sal en la que el catión es la forma protonada del analito a determinar y el anión es un cluster que comprende átomos de boro; y un agente plastificante. Además, la invención también se refiere al uso de dicho sensor para la detección y/o cuantificación de un compuesto que contiene al menos un átomo de nitrógeno.

ES 2 334 748 A1

## DESCRIPCIÓN

Sensores potenciométricos basados en clusters de boro aniónicos.

La presente invención se refiere a dispositivo potenciométrico que comprende una membrana sensora basada en clústeres de boro aniónicos, por tanto, la invención se enmarca en el área científico-técnica de la química, dentro del análisis químico de compuestos que contengan como elemento integrante nitrógeno protonable o que pueda cuaternizarse, y de aplicación para sectores como el químico y/o el farmacéutico.

## Estado de la técnica

En la actualidad hay varios métodos analíticos usados para la determinación de analitos con nitrógeno (como antibióticos, aminoácidos, péptidos, tintes, etc.) en diversos tipos de matrices<sup>1-10</sup> especialmente cromatográficos, espectrofotométricos, voltamperométricos y amperométricos. Estos métodos son muy eficientes pero, en general, son lentos y relativamente caros para el análisis de rutina. Además, estos inconvenientes se agravan para determinaciones fuera del laboratorio. Debido al elevado número de análisis requeridos en la industria farmacéutica (es decir control de calidad, supervisión de los fármacos, etc.) disponer de procedimientos analíticos rápidos se convierte en una necesidad. Los métodos convencionales se basan en el análisis cromatográfico (TLC; HPLC-UV, GC-MS)<sup>11-13</sup>. Estos métodos requieren tratamientos previos algo complejos y mucha dedicación, que los hace inadecuados para analizar una gran cantidad de muestras.

Por otro lado, los métodos analíticos más usados para la determinación del contenido de aminoácidos en medios biológicos y en muestras de alimentos son volumetría, electroforesis capilar, voltamperometría, quimioluminiscencia, amperometría, polarografía, cromatografía acoplada a diversos sistemas de detección (tales como absorción Ultravioleta-visible, fluorescencia, y espectrometría de masas), espectroscopia de fluorescencia y métodos espectrofotométricos<sup>14-19</sup>. Entre estos métodos, la volumetría es simple, pero no es sensible ni selectiva; la electroforesis capilar es un método de alta resolución, pero no es fácil de operar, siendo necesario una persona altamente especializada. Los métodos voltamperométricos son una técnica selectiva, sensible y relativamente barata, pero en muchos casos es difícil de obtener la máxima información. Algunos métodos requieren un pretratamiento sofisticado de las muestras, un tiempo largo para realizar el análisis, aparatos muy costosos y la especialización de personas. Por esta razón es importante desarrollar técnicas más directas y más rápidas para poder determinar compuestos en general, y en particular que contengan nitrógeno.

En algunos de estos métodos electroquímicos (polarografía<sup>20</sup>, voltamperometría<sup>21</sup>) ya se utilizan con buenos resultados en la determinación de compuestos con nitrógeno electroactivo. Para estas aplicaciones se usan electrodos de trabajo tales como carbón, oro o platino. A fin de mejorar la selectividad de la señal electroquímica pueden usarse electrodos modificados químicamente. Estos últimos años, la detección electroquímica ha ganado en importancia como técnica de detección sensible y selectiva para los compuestos electroactivos. Los electrodos serigrafiados representan una de las alternativas más interesantes en el diseño de sensores electroquímicos<sup>22</sup>. Estos electrodos se han divulgado como sensores para análisis biomédico, ambiental e industrial<sup>23</sup>.

Por otro lado, La potenciometría (y más concretamente los electrodos selectivos a iones (ISE's)) es un método analítico muy económico y eficiente para determinar numerosos analitos<sup>28-29</sup>.

En particular, los sensores potenciométricos basados en pares iónicos, basado en azul de metileno-silicotungstato se han utilizado con éxito para la determinación de algunos tintes, como el azul de metileno<sup>24</sup>.

También se han utilizado para la determinación de compuestos farmacéuticos distintos tipos de ISEs basados en moléculas bioespecíficas, intercambio de iones, o transportadores neutros<sup>25-26</sup>.

El método que usa la membrana de PVC es el tipo de ISE más simple, más barato y más directo. Los progresos en análisis farmacéutico con ISEs han permitido la medida directa y selectiva de la actividad de varios cationes o aniones orgánicos de interés farmacéutico, en la mayoría de los casos sin un pretratamiento de la sustancia activa de la matriz de la formulación. La muestra solamente necesita ser disuelta en agua. Así, algunos compuestos farmacéuticos (novocaina, dimedrol, lidocaina, papaverina) ya se han determinado usando ISEs basados en membranas de PVC utilizando el tetrafenilborato como generador del par iónico<sup>27</sup>.

Los electrodos selectivos a iones pueden miniaturizarse a fin de poder utilizarse para el análisis *in vivo* o *in vitro*, para análisis de flujo en la industria o en los puntos del muestreo. Se conoce a partir de datos de la bibliografía que la precisión y la exactitud para la determinación de antibióticos de preparaciones comerciales son generalmente mejores con los sensores de membrana de PVC, que con membranas líquidas<sup>30</sup>.

Un estudio referente a los electrodos selectivos de iones para la determinación de iones amonio orgánicos ha mostrado que los componentes habituales de la membrana eran: plastificantes NPOE, DBP, DNA-dinonil adipato, TEHP tris(2-etilhexil)fosfato y tris(noniloxi)benzenosulfonato potásico (K(TNOBS)); como cambiadores de iones el tetrakis (4-clorofenil)borato de potasio (K(TpCIPB)), y el dibenzo-18-corona-6 como un transportador catiónico neutro; y el nitrato de tetradecilamonio (TDA)NO<sub>3</sub> como un aditivo catiónico<sup>31</sup>.

Los electrodos selectivos de iones son fáciles de fabricar y convenientes para operar, por tanto, este método tiene algunas ventajas sobre otras técnicas; preparar la membrana es simple, los componentes electroactivos fáciles de preparar, y los instrumentos son muy accesibles, más baratos y más fáciles de operar que los requeridos para HPLC, FIA, espectrofotometría. Sin embargo, estas membranas descritas, con respecto a los iones generalmente utilizados como el caso del tetrafenilborato, son poco estables.

### Descripción de la invención

Conocer la existencia de un determinado compuesto químico y su concentración en fluidos biológicos, en líquidos naturales o sintéticos requiere siempre de unas herramientas analíticas que se basan en métodos físicos, químicos o la combinación de ambos. Las herramientas analíticas existentes son muy variadas y prácticamente cualquier compuesto puede detectarse directa o indirectamente; la cuestión está en la complejidad de la técnica, el coste del equipo necesario, la formación requerida al analista, el tiempo requerido para llevar a cabo la detección y cuantificación del analito buscado, o la posibilidad de que el equipo sea móvil o estacionario. Los equipos móviles y de poco peso son importantes y aún pueden serlo más para el control continuo de un determinado analito y para su dispensación controlada, por ejemplo en el caso de que sea un fármaco, o por su disponibilidad en cualquier situación y circunstancia.

En general, los grandes aparatos tienen suficientes opciones que no requieren ser selectivos a un determinado analito; por el contrario los pequeños dispositivos requieren ser selectivos a uno o a unos pocos analitos para ser de interés tecnológico. Por otra parte los grandes aparatos son estacionarios y caros, mientras que los pequeños ofrecen la posibilidad de ser móviles y de poco coste. Estos últimos requieren de un elemento sensor capaz de detectar selectivamente a un analito y su concentración y de un transductor capaz de enviar el señal del tipo que sea, por ejemplo acústico, óptico ó eléctrico, y que debe ser proporcional a la concentración del electrolito.

Por consiguiente el punto clave de un sensor químico móvil es su selectividad, es decir que responda mayoritariamente a un único analito, y que la señal que dé sea proporcional a su concentración.

De esta forma, la presente invención proporciona una membrana que puede acoplarse a diferentes transductores para detectar analitos que estén químicamente relacionados con el catión presente en la membrana. Básicamente los dispositivos sensores resultantes están compuestos de una membrana sensora que incorpora una sal de un anión que es un cluster que contiene boro, entre otros elementos, como por ejemplo, borano, carborano o metalacarborano, mono- o polianiónico, con una forma catiónica del analito a medir, junto con un plastificante y un polímero y otros aditivos opcionales. Más específicamente estos sensores permiten detectar y cuantificar un analito que contenga uno o más átomos de nitrógeno en su molécula.

Existen otras ventajas que hacen de la potenciometría una alternativa para el análisis de compuestos con nitrógeno en relación a otros métodos que se usan actualmente:

- Los electrodos selectivos de iones (ISE's) son fáciles de fabricar y convenientes para operar. El método tiene algunas ventajas sobre otras técnicas utilizadas en el estado de la técnica; preparar la membrana es simple, los componentes electroactivos fáciles de preparar, y los instrumentos son muy accesibles, más baratos y más fáciles de operar que los requeridos para HPLC, FIA ó espectrofotometría.

- La determinación potenciométrica puede realizarse en pocos minutos, en contraste con los tiempos más largos requeridos para el análisis por otros métodos estándar oficiales o convencionales.

- En la presente invención, se describe la construcción y las características de funcionamiento generales de un sensor potenciométrico de membrana de plástico para los compuestos con nitrógeno. Algunos de los analitos a determinar pueden ser antibióticos, para el tratamiento de la tuberculosis, tales como la isoniácida ó la pirazinamida. Se demostró la facilidad para convertir una interferencia, por ejemplo, la pirazinamida es una interferencia para el ISE de isoniácida, en el ión principal de otro ISE. Es decir, en un segundo electrodo el ión principal es la pirazinamida mientras que la isoniácida es el ión interferente. Ambos electrodos son prácticamente idénticos y están basados en el anión cobaltobisdicarburo. Los electrodos de la presente invención exhiben buenas características analíticas para la determinación del analito sin requerirse ninguna separación previa, y presentan una buena reproducibilidad.

- La membrana del ISE no sólo actúa como matriz polimérica para la liberación controlada del reactivo, tal como ocurre en los sistemas de liberación poliméricos para los sensores ópticos, sino que también actúa como transductor para la detección potenciométrica selectiva. Esta combinación hace que el ISE sea muy atractivo para la miniaturización del sensor.

- En los ISEs, la composición de la membrana representa la parte más importante de este "dispositivo". Solamente cambiando la parte electroactiva (o sustancia electroactiva) de la membrana es posible tener otro electrodo selectivo a otro analito que permita determinarlo de una matriz compleja, como muestras farmacéuticas, clínicas o ambientales.

- El punto diferencial de la membrana de la presente invención con respecto a los iones generalmente utilizados como el tetrafenilborato, es que los aniones del par iónico en esta invención son capaces de autoorganizarse a través de enlaces dihidrógeno  $C-H \cdots H-B$ , (metalacarboranos) y de estar enlazados no covalentemente al plastificante a través de enlaces hidrógeno  $C-H \cdots O$ , (metalacarboranos) o que puedan tener enlaces débiles dihidrógeno  $B-H \cdots H-N$  con

## ES 2 334 748 A1

el catión electroactivo. Todo ello implica una mayor estabilidad de la red fijando los aniones y dotándoles de una movilidad más restringida. Esto produce mejores membranas sensoras y poder detectar compuestos muy parecidos tales como enantiómeros.

Por tanto, un primer aspecto de la presente invención, comprende una membrana para un sensor potenciométrico caracterizado porque comprende (a partir de ahora membrana de la invención):

- un material termoplástico
- una sustancia electroactiva; y
- un agente plastificante.

La sustancia electroactiva de la membrana de la invención es una sal del tipo  $[\text{cation}]_x[\text{anion}]_y$ , en que:

- el catión es una forma protonada del analito a determinar o es el mismo analito si éste ya está, en condiciones normales, en forma catiónica. Este catión puede tener una, dos o más cargas positivas dependiendo de a qué concentración de ácido ha tenido lugar la protonación y del número de nitrógenos protonables que tiene el analito o de aquellos que en condiciones normales ya estén cargados positivamente

- el anión de la sal es un cluster que contiene átomos de boro, entre otros elementos.

Por “cluster que contiene átomos de boro” se entiende en la presente invención a un compuesto de forma poliédrica donde los vértices están ocupados mayoritariamente por átomos de boro. Estos clústeres pueden ser, pero sin limitarse, borano, carborano o metalocarborano con una, dos o más cargas negativas.

Una realización preferida de la membrana de la invención, comprende una sal en la que el anión es borano de fórmula  $(\text{B}_n\text{X}_m\text{H}_{n-m})^{2-}$  ó  $(\text{LB}_n\text{H}_n)^-$ , donde:

n tiene un valor de entre 6 y 12,

X se selecciona de la lista que comprende hidrógeno (H), halógeno, grupo alquilo o grupo arilo,

m tiene un valor de entre 0 y 12

L es un grupo  $\text{XR}'\text{R}''\text{R}'''$  ó  $\text{XR}'\text{R}''$ ; donde X es un átomo de nitrógeno (N), fósforo (P), azufre (S) u oxígeno (O) y  $\text{R}'$ ,  $\text{R}''$  y  $\text{R}'''$  son radicales, iguales o diferentes, seleccionado de entre un átomo de H, un grupo alquilo o un grupo arilo.

Cuando m es igual a 0, es decir, X no existe y la fórmula sería  $(\text{B}_n\text{H}_n)^{2-}$ . Ejemplos de este tipo de aniones, pueden ser, pero sin limitarse a  $(\text{B}_{10}\text{H}_{10})^{2-}$  o  $(\text{B}_{12}\text{H}_{12})^{2-}$ .

Otra realización preferida de la membrana de la invención, comprende una sal en la que el anión es carborano, y tiene la fórmula  $(\text{RCB}_n\text{X}_m\text{H}_{n-m})^-$ , donde:

R es H, un grupo alquilo o un grupo arilo,

n tiene un valor de entre 5 y 11,

X es un halógeno, un grupo alquilo o un grupo arilo y

m tiene un valor de entre 0 y 11.

Cuando m es igual a 0, es decir, X no existe y la fórmula sería  $(\text{RCB}_n\text{H}_n)^-$ . Ejemplos de este tipo de aniones, puede ser, pero sin limitarse a  $(\text{CB}_{11}\text{H}_{12})^-$  ó  $(\text{CB}_9\text{H}_{10})^-$ .

Otra realización preferida de la membrana de la invención, comprende una sal en la que el anión es metalocarborano y tiene la fórmula  $[\text{M}(\text{C}_2\text{B}_9\text{H}_{11})_2]^-$ ,  $[\text{M}(\text{C}_2\text{B}_9\text{H}_{11})_2]^{2-}$ , cualquiera de sus derivados, como por ejemplo pero sin limitarse a  $[\text{M}(\text{C}_2\text{B}_9\text{H}_{11-y}\text{X}_y)_2]^-$  (donde X= hidrógeno, halógeno, un grupo alquilo o un arilo) o cualquier combinación mono- o di-iónica de al menos dos metalocarboranos, donde M es un metal trivalente o divalente. Ejemplos de este tipo de aniones, puede ser, pero sin limitarse a  $[\text{Co}(\text{C}_2\text{B}_9\text{H}_{11})_2]^-$ ,  $[\text{Co}(\text{C}_2\text{B}_9\text{H}_8\text{Cl}_3)_2]^-$ ,  $[\text{Co}(\text{C}_2\text{B}_9\text{H}_8\text{Br}_3)_2]^-$  ó  $[\text{Co}(\text{C}_2\text{B}_9\text{H}_8\text{I}_3)_2]^-$ .

Por “alquilo” se entiende en la presente invención a cadenas alifáticas, lineales o ramificadas, que tienen uno o más átomos de carbono, preferiblemente entre 1 y 20, más preferiblemente entre 1 y 10. Como por ejemplo, pero sin limitarse a metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, t- butilo, n-pentilo, etc.

5 Por “arilo” se entiende en la presente invención a una cadena carbocíclica aromática, que tienen 6 o más átomos de carbono, preferiblemente de 6 a 12 átomos de carbonos, pueden ser de anillo único ó múltiple, separados y/o condensados. Los grupos arilo típicos contiene de 1 a 3 anillos separados o condensados y desde 6 hasta aproximadamente 18 átomos de carbono de anillo, tales como radicales fenilo, naftilo, indenilo, fenantrilo o antracilo.

10 En otra realización preferida de la membrana de la invención, el material termoplástico es cloruro de polivinilo (PVC) u otros plásticos con las mismas características, como por ejemplo, pero sin limitarse a polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (PS), metacrilato (PMMA), policloruro de vinilo (PVC), politereftalato de etileno (PET), teflón (o politetrafluoretileno, PTFE) ó nylon (un tipo de poliamida). Más preferiblemente el material termoplástico es PVC.

15 En otra realización preferida de la membrana de la invención el agente plastificante puede ser un ácido policarboxílico o cualquiera de sus sales o sus esteres derivados, como por ejemplo pero sin limitar a el ácido ftálico, butil bencil ftalato (Bps), dibutilftalato (DBP), dietilhexil ftalato (DEHP), diisononil ftalato (DINP), dioctil ftalato (DOP), ácido adípico, bis(2-etilhexil)adipato (DEHA), dimetil adipato (DMAD), monometil adipato (MMAD), dioctil adipato (DOA), derivados del ácido sebácico como el Dibutil sebacato (DBS), bis(2-etilhexilsebacato) DOS; derivados del ácido maleico, como el Dibutil maleato (DBM) o el Diisobutil maleato (DIBM). Otros agentes plastificantes pueden ser benzoato, aceite vegetal epoxidizado, sulfonamida (BBSA-NBBS), organofosfato, como por ejemplo, pero sin limitarse a tricresil fosfato (TCP) ó tributil fosfato (TBP), poliéter derivado de glicol o plastificantes poliméricos derivados del nitrobenzeno, como por ejemplo, pero sin limitarse a nitrofeniloctileter (NPOE), nitrofenilhexileter (NPHE),  
25 disulfuro de carbono o  $\beta$ -naftil salicilato.

Adicionalmente en la membrana de la invención se pueden incorporar otros aditivos.

30 La membrana de la invención se puede depositar sobre una superficie conductora, semiconductora o no conductora del transductor. En el caso particular de un ISE esta membrana se deposita sobre un conductor, o un semiconductor como grafito, o grafito compactado con material aglutinante, o bien sobre un conductor polimérico orgánico para producir un electrodo potenciométrico. Este detectará a un analito que esté químicamente relacionado con el catión presente en la sal.

35 Por tanto, un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un electrodo selectivo a iones (ISE) caracterizado porque comprende la membrana de la invención sobre un soporte conductor o semiconductor eléctrico, que preferiblemente puede ser grafito, cualquier combinación con grafito o un polímero orgánico (a partir de ahora ISE de la invención).

40 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un sensor potenciométrico caracterizado porque comprende el electrodo selectivo a iones de la invención y un transductor. Un transductor que puede ser eléctrico, electrónico, electro-mecánico, electromagnético, fotónico, o fotovoltaico.

45 El procedimiento de obtención de la membrana de la invención comprende la preparación de la sal que se obtiene precipitando en agua u otro disolvente un catión del analito que se desea medir, por ejemplo un aminoácido (A) protonado  $[H_xA]^{x+}$ , con un anión que consiste en un cluster que contiene al menos átomos de boro, por ejemplo  $[Co(C_2B_9H_{11})_2]^-$ , dando una sal cuya composición del tipo  $[cation]_x[anion]_y$ .

50 El precipitado resultante se mezcla con PVC u otro plástico termoplástico y un agente plastificante como dioctilftalato u otro descrito más arriba.

Una vez obtenida la membrana de la invención, esta se disuelve en un disolvente, como por ejemplo, pero sin limitarse a THE (tetrahidrofurano) y se deposita sobre un conductor o semiconductor, por ejemplo, pero sin limitarse a grafito o polipirrol y así generar un electrodo selectivo a iones que será sensible al analito (A) cuya forma protonada es el catión  $[H_xA]^{x+}$ , de la sal.

60 La composición de la membrana de la invención, en lo que se refiere a la naturaleza de los constituyentes y a su % en peso, anión, agente plastificante y material termoplástico junto con otros elementos, si cabe, dependerá del analito A que se desea medir y variará para cada caso.

Asimismo el catión de A,  $[H_xA]^{x+}$ , puede requerir un valor distinto de x que se puede lograr a una mayor o menor concentración de ácido a la hora de ser protonado. Así, para preparar la sal  $[catión][anión]$  se disuelve A en una solución, en general acuosa, pero que puede ser en otro disolvente, conteniendo una cierta concentración de ácido en función del grado de protonación que se requiera. Por ejemplo, A puede tener dos o más nitrógenos en su molécula, y no ser conveniente que se protonen todos para obtener una mejor selectividad del sensor, y a esta solución se añade un anión que consiste en un cluster que contiene átomos de boro, como por ejemplo, pero sin limitarse a anión  $[Co(C_2B_9H_{11})_2]^-$ , u otro borano, carborano o metalacarborano, y se obtiene un precipitado,  $[catión][anión]$ . Este precipitado se va a filtrar y secar y estará a punto para mezclarse con los otros componentes de la membrana.

Por consiguiente, tanto la membrana, como el ISE, como el sensor de la presente invención se diseñan a partir del compuesto que se desea medir, A, con átomos de nitrógeno en su molécula, que puedan protonarse o que ya estén en una forma cargada positivamente. A partir de aquí se obtiene una sal, [catión][anión] con un anión como el descrito en la presente invención. Esta sal se mezcla en PVC u otro material termoplástico y un agente plastificante. La composición química de la membrana, el grado de protonación de A, y la proporción de los componentes se obtiene por un proceso de optimización de la respuesta del sensor a la concentración de A en una solución de prueba, en la que se busca la linealidad de la respuesta física a la concentración, que en el caso del sensor potenciométrico sea lo más próxima a 60 mV/z siendo z la carga del analito, la mejor sensibilidad, es decir, la mínima concentración que pueda detectar y la mejor selectividad a otros iones interferentes.

La membrana de la invención es la parte sensible del dispositivo para medir analitos que contengan en su molécula átomos de nitrógeno.

Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere al uso del sensor potenciométrico de la invención o del electrodo selectivo a iones de la invención, para la detección y/o cuantificación de un analito que contiene al menos un átomo de nitrógeno.

Otro aspecto más de la invención se refiere al uso del sensor potenciométrico de la invención o del electrodo selectivo a iones de la invención, para la detección y/o cuantificación selectiva de enantiómeros.

Preferiblemente la detección y/o cuantificación se lleva a cabo en fluidos biológicos (sangre, plasma, suero u orina) u otros líquidos, naturales o sintéticos.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la selectividad de los ISE de la invención.

### Ejemplo 1

#### ISE para Pirazinamida

##### Preparación de la sal par iónico

En primer lugar,  $\text{H}^+[\text{Co}(1,2\text{-C}_2\text{B}_9\text{H}_{11})_2]^-$  se obtuvo a partir de  $\text{Cs}[\text{Co}(1,2\text{-C}_2\text{B}_9\text{H}_{11})_2]$  (0.30 g) y HCl 1 M (15 mL), extrayendo el producto con éter dietílico (20 mL). La extracción se repitió 3 veces. El sólido obtenido se secó al vacío hasta peso constante. Pirazinacarboxamida (PZA) (0.0123 g) se disolvió en 10 mL de HCl 3 M con agitación (solución 1). Seguidamente, el compuesto par iónico  $\text{H}[\text{H-PZA}]_2[\text{cos}]_3$  se preparó mezclando 10 mL de “solución 1” 0.01 M con 10 mL de solución de  $\text{H}^+[\text{Co}(1,2\text{-C}_2\text{B}_9\text{H}_{11})_2]^-$  0.01 M también con agitación resultando un precipitado amarillo. El precipitado fue filtrado, se lavó con una solución de HCl 0.1 M y se secó al vacío.

##### Preparación del electrodo selectivo a iones

La composición de la membrana de ISE para detectar pirazinamida se consiguió disolviendo 7.0% (w/w) (0.040 g) de  $\text{H}[\text{H-PZA}]_2[\text{cos}]_3$  en 63.0% (w/w) (0.360 g) de plastificante (o-nitro fenil octil eter, NPOE o di-octil ftalato, DOP o di-butyl phthalate, DBP) bajo agitación. Después 30.0% (w/w) de polvo de PVC (0.1714 g) se esparció en 6 mL de THF con agitación hasta que se obtuvo una solución viscosa y nítida. Estas dos soluciones se mezclaron agitándolas hasta que se consiguió homogeneidad. Esta mezcla se depositó con cuidado mediante una pipeta sobre la superficie del cuerpo del electrodo y se permitió que el disolvente se evaporara a temperatura ambiente durante dos días. Cuando los electrodos no se utilizan se almacenan al aire, pero antes de usarse deben mantenerse 2 h en una solución diluida de analito  $10^{-4}$  M.

##### Aparatos utilizados:

1. pH/millivoltmeter Crison micropH 2000

2. Ag/AgCl, KCl electrodo de referencia

3. El cuerpo del electrodo selectivo a iones se preparó de acuerdo con S. Alegret, *et al.* (S. Alegret, J. Alonso, J. Bartroli, J. M. Paulis, J.L.F.C. Lima y A.A.S.C. Machado, *Anal. Chim. Acta*, 1984, 164, 147)

## ES 2 334 748 A1

Tal como se muestra en las Tablas 1 y 2, los ISEs para PZA presentaron buenos resultados, alta selectividad y propiedades de electrodo excelentes. A pesar de que la composición general de la membrana era similar, los resultados indicaron que la membrana de PVC conteniendo NPOE como plastificante ofrecía los mejores resultados con una pendiente de 56.98 mV/década, linealidad en el rango de concentración  $5.00 \cdot 10^{-4}$ - $1.00 \cdot 10^{-1}$  M, siendo  $3.00 \cdot 10^{-5}$  M el límite de detección, y con una vida media mínima (probada) de 45 días.

TABLA 1

*PZA Características de Electrodo*

Plastificante	NPOE	DOP	DBP
Pendiente mV/década	56.98	46.70	46.64
Coefficiente de correlación	0.9971	0.9975	0.9988
Rango de concentración (M)	$5.00 \cdot 10^{-4}$ - $1.00 \cdot 10^{-1}$	$5.00 \cdot 10^{-5}$ - $1.00 \cdot 10^{-1}$	$5.00 \cdot 10^{-5}$ - $1.00 \cdot 10^{-1}$
Límite de Detección (M)	$3.00 \cdot 10^{-5}$	$1.00 \cdot 10^{-5}$	$2.00 \cdot 10^{-5}$
Tiempo de respuesta/s	< 5	< 5	< 5
Vida media/días	> 45	> 45	> 45
pH	2.20-9.50	2.20-9.50	2.20-9.50

TABLA 2

*Coefficientes de Selectividad del electrodo PZA para distintos iones*

Especies Interferentes	NPOE	DOP	DBP
Na <sup>+</sup>	-3.36	-5.19	-4.36
K <sup>+</sup>	-5.32	-6.39	< -7
Ca <sup>2+</sup>	-6.34	< -7	< -7
Mg <sup>2+</sup>	-4.32	< -7	< -7
INH	< -7	< -7	< -7
sulfanilamida	-6.02	< -7	< -7

La Tabla 2 muestra los coeficientes de selectividad para iones de importancia biológica junto con los antibióticos INH (isoniazida) y sulfanilamida. Los coeficientes de selectividad potenciométricos ( $K_{A/B}^{\text{pot}}$ ) se determinaron por el método de la interferencia fija (FIM). La concentración de base se mantuvo constante a  $10^{-3}$  M para todos los iones interferentes.

## Ejemplo 2

## ISE para DL-Triptófano (DL-Try)

Preparación de la sal par iónico: En primer lugar,  $H^+[Co(1,2-C_2B_9H_{11})_2]^-$  se obtuvo a partir de  $Cs[Co(1,2-C_2B_9H_{11})_2]$  (0.3000 g) y HCl 1 M (15 mL), extrayendo el producto con éter dietílico (20 mL). La extracción se repitió 3 veces. El sólido obtenido se secó al vacío hasta peso constante. DL-Triptófano (0.0102 g) se disolvieron en 5 ml de HCl 3 M con agitación (solución 1). Seguidamente, el compuesto par iónico  $[Try]^+[cos]^-$  se preparó mezclando la "solución 1" con 0.0165 g de  $H^+[Co(1,2-C_2B_9H_{11})_2]^-$  también con agitación resultando un precipitado amarillo. El precipitado fue filtrado, se lavó con una solución de HCl 1 M y se secó al vacío.

## Preparación del electrodo selectivo a iones

La composición de la membrana de ISE para detectar el DL-Triptófano se consiguió disolviendo 4.0% (w/w) (0.0400 g) de  $[Try]^+[cos]^-$  en 63.0% (w/w) (0.6300 g) plastificante (di-butilftalato, DBP) bajo agitación. Después 33.0% (w/w) de polvo de PVC (0.3300 g PVC) se esparció en 6 mL de THE con agitación hasta que se obtuvo una solución viscosa y nítida. Estas dos soluciones se mezclaron agitándolas hasta que se consiguió homogeneidad. Esta mezcla se depositó con cuidado mediante una pipeta sobre la superficie del cuerpo del electrodo y se permitió que el disolvente se evaporara a temperatura ambiente durante dos días. Otra membrana de ISE para DL-Triptófano se obtuvo disolviendo 7.0% (w/w) (0.0700 g)  $[Try]^+[cos]^-$  en 31.0% (w/w) (0.3100 g) plastificante (bis (2-etilhexil)ftalato), bajo agitación. Luego 62.0% (w/w) de polvo de PVC (0.6200 g PVC) se esparció en 2 mL THE y se trató como antes.

Cuando los electrodos no se utilizan se almacenan al aire, pero antes de usarse deben mantenerse 2 h en una solución diluida de analito  $10^{-4}$  M.

Los aparatos utilizados fueron:

1. pH/millivoltmeter Crison micropH 2000

2. Ag/AgCl, KCl electrodo de referencia

3. El cuerpo del electrodo selectivo a iones se preparó de acuerdo de acuerdo con S. Alegret, *et al.* (S. Alegret, J. Alonso, J. Bartoli, J. M. Paulis, J. L. F. C. Lima and A. A. S. C. Machado, *Anal. Chim. Acta*, 1984, 164, 147)

Tal como se muestra en las Tablas 3 y 4, los ISEs para DL-Try presentaron buenos resultados, alta selectividad y propiedades de electrodo excelentes. Los resultados indicaron que la membrana de PVC con DBP como plastificante ofrecía los mejores resultados con una pendiente de 57.25 mV/decada, linealidad en el rango de concentración  $5.00 \cdot 10^{-6}$ - $1.00 \cdot 10^{-1}$  M, siendo  $1.00 \cdot 10^{-6}$  M el límite de detección, y con una vida media mínima (probada) de 45 días.

TABLA 3

## DL-Try Características de Electrodo

Plastificante	DBP	bis(2-etilhexil)ftalato
Pendiente mV/decada	57.25	50.67
Coeficiente de Correlación	0.9924	0.9966
Rango de Concentration (M)	$5.00 \cdot 10^{-6}$ - $1.00 \cdot 10^{-1}$	$5.00 \cdot 10^{-5}$ - $1.00 \cdot 10^{-1}$
Límite de Detection (M)	$1.00 \cdot 10^{-6}$	$1.00 \cdot 10^{-5}$
Tiempo de respuesta/s	<5	< 5
Vida media/días	> 45	> 45



TABLA 4

*Coefficientes de Selectividad del electrodo DL-Try para distintos aminoácidos*

Especie interferente	DBP	bis(2-etilhexil)ftalato
glicina	-3.66	-2.86
β-alanina	-2.11	-2.80
DL-leucina	-4.91	-3.26
DL-metionina	-4.63	-2.73
L-arginina	-4.07	-3.48
L-histidina	-3.18	-2.61

La Tabla 4 muestra los coeficientes de selectividad para otros aminoácidos. Los coeficientes de selectividad potenciométricos ( $K^{\text{pot}}_{A/B}$ ) se determinaron por el método de la interferencia fija (FIM). La concentración de base se mantuvo constante a  $10^{-3}$  M para todos los iones interferentes.

#### Referencias

1. Safavi, A.; Abbasitabar, F.; Hormozi Nezhad, M.R. *Chem. Anal.- Warsaw* **2007**, 52, 835.
2. Shahrokhian, S.; Amiri, M.; *Microchim. Acta* **2007**, 157, 149.
3. Milán-Segovia, R.; Pérez-Flores, G.; Torres-Tirado, J.D.; Hermosillo-Ramírez, X.; Vigna-Pérez, M.; Romano-Moreno, S. *Acta Chromatogr.* **2007**, 19, 110.
4. Nemutlu, E.; Çelebier, M.; Uyar, B.; Altinöz, S. *J. Chromatogr. B.* **2007**, 854, 35.
5. Xiong, Y.; Zhou, H.; Zhang, Z.; He, D.; He, C. *Spectroc. Acta Pt. A – Molec. Biomolec. Spectr.* **2007**, 66, 341.
6. Majidi, M.R.; Jouyban, A.; Asadpour-Zeynali, K. *J. Electroanal. Chem.* **2006**, 589, 32.
7. Quintino, M.S.M.; Angnes, L J. *Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, 42, 400.
8. Hao, Y.X.; Xiao, Y.H. *Anal. Lett.* **2005**, 38, 1405.
9. Calleja I., Blanco-Prieto MJ, Ruz N, Renedo MJ, Dios-Vieitez MC, *J Chromatogr A*, **2004**, 1031, 289
10. D. T.-T. Nguyen, D. Guillarme, S. Rudaz, J. L. Veuthey, *J. Sep. Sci.*, **2008**, 31, 1050.
11. P. Scherpenisse, A. A. Bergwerff, *Anal. Chim. Acta*, **2005**, 529, 173.
12. T. Goldmann, F. Taroni, P. Margot, *J. Forensic Sci.*, **2004**, 49, 716.
13. L. –H. Ahlström, E. Björklund, L. Mathiasson, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2005**, 382, 1320
14. A.R. Fiorucci, E.T.G. Cavalheiro, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **28** (2002) 909–915.
15. Y.D. Liang, J.F. Song, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2005**, 38, 100
16. K.D. Altria, P. Harkin, M.G. Hindson, *J. Chromatogr. Biomed.* **1996**, 686, 103
17. A.M. El-Brashy, S.M. Al-Ghannam, *Microchem. J.*, **1996**, 53, 420
18. Z.J. Shen, Z.M. Sun, L. Wu, K. Wu, S. Sun, Z.B. Huang, *J. Chromatogr. A*, **2002**, 979, 227
19. L. Moreno, A. Merkoci, S. Alegret, S. Hernández-Cassou, J. Saurina, *Anal. Chim. Acta*, **2004**, 507, 251.
20. S.T. Sulaiman, Y.O. Hameed, *Anal. Chim. Acta*, **1988**, 206, 379.

## ES 2 334 748 A1

21. J.A. **Tong**, X.J. **Dang**, H.L. **Li**, *Electroanalysis*, 1997, 9, 165.

22. **Vasjari M.**, **Merkori A.**, **Hart P. J.**, **Alegret S.**, *Microchim. Acta*, 2005, 150, 233.

23. M.M. **Yust**, J. **Pedroche**, J. **Girón-Calle**, J. **Vioque**, F. **Millán**, *Food Chem.* 2004, 85, 317.

24. Meng Liang **Wen**, Yi Bin **Zhao**, Xiang **Chen**, Chang Yi **Wang**, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1999, 18, 957.

25. G.E. **Baiulescu**, V.V. **Cosofret**, *Applications of ion selective membrane electrodes in organic analysis*, 1977, Wiley, New York.

26. T.S. **Ma**, S.S.M. **Hassan**, *Organic Analysis Using Ion-Selective Electrodes*, 1982, Academic Press, London.

27. E.G. **Kulapina**, O.V. **Barinova**, *J. Anal. Chem.*, 2001, 56, 518

28. J. **Wang**, *Analytical Electrochemistry*, 3rd Edition, Wiley-VCH, New York, 2006.

29. R. De **Marco**, G. **Clarke** and B. **Pejcic**, *Electroanalysis*, 2007, 19-20, 1987.

30. L. **Campanella**, F. **Mazzei**, R. **Sbrilli**, M. **Tomassetti**, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1988, 6, 299.

31. **Vladimir V. Egorov**, **Alexander A. Bolotin**, *Talanta*, 2006, 70, 1107

## REIVINDICACIONES

1. Membrana para un sensor potenciométrico **caracterizado** porque comprende:

- un material termoplástico
- una sustancia electroactiva basada en una sal en la que el catión es la forma protonada del analito a determinar y el anión es un cluster que comprende átomos de boro; y
- un agente plastificante.

2. Membrana según la reivindicación 1, en la que el anión es mono- ó polianiónico.

3. Membrana según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en la que el cluster de boro se selecciona de la lista que comprende un borano, un carborano o un metalocarborano.

4. Membrana según la reivindicación 3, en la que el borano tiene la fórmula  $(B_nH_n)^{2-}$ ,  $(B_nX_mH_{n-m})^{2-}$  ó  $(LB_nH_n)^-$ , donde:

n tiene un valor de entre 6 y 12,

X se selecciona de la lista que comprende hidrógeno, halógeno, un grupo alquilo o un grupo arilo,

m tiene un valor de entre 0 y 12,

L es un grupo  $XR'R''R'''$  ó  $XR'R''$ ; donde X es un átomo de N, P, S u O y  $R'$ ,  $R''$  y  $R'''$  son radicales, iguales o diferentes, seleccionados de entre un átomo de H, un grupo alquilo o arilo.

5. Membrana según la reivindicación 3, en la que el carborano tiene la fórmula  $(RCB_nH_n)^-$  ó  $(RCB_nX_mH_{n-m})^-$ , donde:

R es H, un grupo alquilo o un grupo arilo,

n tiene un valor de entre 5 y 11,

X es un halógeno, un grupo alquilo o un grupo arilo y

m tiene un valor de entre 0 y 11.

6. Membrana según la reivindicación 3, en la que el metalocarborano tiene la fórmula  $[M(C_2B_9H_{11})_2]^-$ ,  $[M(C_2B_9H_{11})_2]^{2-}$  cualquiera de sus derivados o cualquier combinación mono- o di-iónica de al menos dos metalocarboranos, donde M es un metal trivalente o divalente.

7. Membrana según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el material termoplástico es cloruro de polivinilo (PVC).

8. Membrana según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el agente plastificante se selecciona de la lista que comprende un ácido policarboxílico o cualquiera de sus sales, benzoato, aceite vegetal epoxidizado, sulfonamida, organofosfato, poliéter derivado de glicol o cualquier plastificante polimérico derivado del nitrobenzeno.

9. Membrana según la reivindicación 8, en la que el ácido policarboxílico se selecciona de la lista que comprende ácido ftálico, ácido adipico, ácido sebácico o ácido maleico.

10. Electrodo selectivo a iones (ISE) **caracterizado** porque comprende una membrana según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 sobre un soporte conductor o semiconductor eléctrico.

11. Electrodo selectivo a iones según la reivindicación 11, donde el soporte es grafito, cualquier combinación con grafito o un polímero orgánico.

12. Sensor potenciométrico **caracterizado** porque comprende un electrodo selectivo a iones según cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11 y un transductor.

## ES 2 334 748 A1

13. Uso del sensor potenciométrico según la reivindicación 12 o del electrodo selectivo a iones según cualquiera de las reivindicaciones 10 ú 11, para la detección y/o cuantificación de un analito que contiene al menos un átomo de nitrógeno.

5 14. Uso del sensor potenciométrico según la reivindicación 12 o del electrodo selectivo a iones según cualquiera de las reivindicaciones 10 ú 11, para la detección y/o cuantificación selectiva de enantiómeros.

15. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14, donde la detección se realiza en fluidos biológicos u otros líquidos, naturales o sintéticos.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 334 748

⑫ Nº de solicitud: 200802603

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 12.09.2008

⑭ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: **G01N 27/333** (2006.01)  
H01G 9/04 (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 5985117 A (BACHAS et al.) 16.11.1999, figura 2; columna 3, líneas 35-67; columna 4, líneas 1-10,65-67; columna 5, líneas 1-7; columna 6, líneas 40-55.	1-10
X	JOHAN BOBACKA et al. "Influence of anionic additive on Hg <sub>2</sub> <sup>+</sup> interference on Ag <sup>+</sup> -ISEs based on [2.2.2]p,p,p-cyclophane as neutral carrier" TALANTA 10.05.2004 Vol. 63 páginas 135-138; apartados 1-2, Tabla 1.	1-5,7-12
X	US 2005023153 A1 (BAKKER et al.) 03.02.2005, párrafos [0015],[0074-0083].	1-5,7-10, 13,15
X	SHANE PEPPER et al. "Ion-Pairing Ability, Chemical Stability, and Selectivity Behavior of Halogenated Dodecarborane Cation Exchangers in Neutral Carrier-Based Ion-Selective Electrodes" Anal. Chem. 01.05.2003 Vol. 75 páginas 2131-2139; todo el documento.	1-9

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

11.02.2010

Examinador

V. Balmaseda Valencia

Página

1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N, H01G

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC,WPI,XPESP,NPL,ISI-WEB

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 11.02.2010

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones 1-15	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones 1-15	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión:**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

**1. Documentos considerados:**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 5985117 A	16-11-1999
D02	TALANTA Vol.63 páginas 135-138	10-05-2004
D03	US 2005023153 A1	03-02-2005
D04	Anal. Chem. Vol.75 páginas 2131-2139	01-05-2003

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

El objeto de la presente invención es una membrana para un sensor potenciométrico, un electrodo selectivo de iones (IES) que comprende dicha membrana y su uso para la detección y/o cuantificación de un analito que contiene al menos un átomo de nitrógeno en fluidos biológicos u otros líquidos.

El documento D01 describe una membrana para un electrodo sensor de iones basada en el uso de un metalcarborano de mercurio (figura 2). Dicha membrana comprende además como material termoplástico cloruro de polivinilo (PVC), como agente plastificante o-nitro fenil octil ftalato (NPOE) y como aditivo iónico cloruro de tridodecilamonio (columna3, líneas 35-67; columna 4, líneas 1-10, columna 5, líneas1-7). A partir de estas membranas se fabrican electrodos sensores de iones mediante su combinación con un soporte conductor (un hilo de plata) (columna 4, líneas 35-45) para la detección potenciométrica de iones cloruro en fluidos biológicos de distinta naturaleza (columna 6, líneas 45-55).

En el documento D02 se estudia la influencia de la adición de 7,8,9,10,11,12-hexabromocarborano sobre electrodos sensores de iones plata. Para ello se construyen varios electrodos sensores de iones plata depositando con membranas de distinta composición una de las cuales comprende un 0-2,6% en peso de [2.2.2]p,p,p-ciclofano, 0,9% en peso de AgCB11H6Br6, 64.4%-66.1% en peso de o-NPOE y 33% en peso de PVC sobre un contacto sólido de poli(3,4-etiledioxitiofeno) (apartados 1-2, Tablas 1).

En el documento D03 se describen membranas para la detección selectiva y reversible de poliiones (heparina y protamina) en sangre (apartado [0015]). Dichas membranas comprenden como material termoplástico PVC, como sustancia electroactiva, entre otras, dodecarboranos halogenados o alquilados y como agente plastificante entre otros 2-nitro fenil octil ftalato (apartados [0074-0089]).

En el documento D04 se estudia el comportamiento de distintos compuestos halogenados a partir de dodecarborano como intercambiadores catiónicos en electrodos selectivos de iones. Para ello se preparan electrodos selectivos de iones mediante la mezcla de dichos compuestos con un material termoplástico (PVC) y un agente plastificante (sebacato de di(2-etilhexilo)(páginas 2132-2133).

Así por tanto, las características técnicas recogidas en las reivindicaciones 1-15 son conocidas de los documentos citados. En consecuencia, se considera que el objeto de la presente invención, tal y como se ha definido en dichas reivindicaciones, carece de novedad y actividad inventiva de acuerdo con los Artículos 6.1 y 81. de la L.P.